

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11852

研究課題名(和文) 発生母地に依存する骨組織由来間葉系細胞の多分化能の解明とその臨床的意義

研究課題名(英文) The Changes in multipotency of bone tissue-derived mesenchymal cells by donor site and its clinical significance.

研究代表者

山崎 安晴 (Yamazaki, Yasuharu)

北里大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00210401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：腸骨由来か顎顔面骨由来かによるヒト骨由来間葉系細胞(MSCs)の生物学的特性と網羅的遺伝子発現解析を行い、次にMSCsの骨分化誘導時の培養上清中のエクソソームの役割を、さらにMSCsの長期凍結保存の可能性を検討した。その結果、生物学的特性では採取部位によるMSCsの分化能の差を認め、さらに網羅的遺伝子発現解析では腸骨由来MSCsのDEGsはその多くはHOX遺伝子であることがわかった。エクソソームは移植床の環境と細胞流入に関連する可能性が示唆された。また長期凍結保存による老化は進んでいない可能性が示され、長期凍結保存されたMSCsでも基礎研究に有益と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨由来間葉系細胞は主に膜性骨化、腸骨由来間葉系細胞は主に軟骨内骨化の形態をたどる。それは発生学的には顎骨由来間葉系細胞は神経堤由来であり腸骨由来間葉系細胞は中胚葉由来と異なるため、そのことから顎骨由来間葉系細胞と腸骨由来間葉系細胞との分化誘導能に差異が生じていると考えられた。従って臨床での骨移植再建の際はこれらの性質を十分に理解し、より適した部位をドナーとして選択する事が望ましいと思われた。

研究成果の概要(英文)：Biological characteristics and next generation RNA-sequencing analysis of human bone-derived mesenchymal cells (MSCs) depending on whether they are derived from iliac bone or maxillofacial bone, then exosomes in the culture supernatant during induction of bone differentiation of MSCs, moreover the changes of long-term cryopreservation MSCs were investigated. As a result, in biological characteristics, a difference in the differentiation ability of MSCs depending on the collection site was observed, and next generation RNA-sequencing analysis revealed that most of the iliac MSCs DEGs are HOX genes. It was suggested that exosomes may be related to the environment of the transplant bed and cell influx. In addition, aging due to long-term cryopreservation may not have progressed, and long-term cryopreservation MSCs may be useful for basic research.

研究分野：再生医工学

キーワード：未分化間葉系細胞 再生医工学 エクソソーム 神経堤由来細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唇顎裂や唇顎口蓋裂の一貫治療として、顎裂部骨移植は不可欠な治療となっている。手術時期は(5~6歳)から成人年齢(20歳前後)と広い年齢層に及び、またこれらいずれの骨移植も移植骨のdonorとしては自家腸骨海綿骨が第一選択されているのが実状である。しかし移植時期が低年齢であったり、recipientの母床の悪条件下では骨吸収が進行し再度の骨移植が必要な場合など、donorとしての腸骨に与える影響が大きく、採骨部の将来に及ぼす形態的・審美的影響は未知数である。そこで我々は腸骨採取の軽減の目的から採取された骨組織からの骨由来間葉系細胞(MSCs)の分離・増殖・凍結保存法の確立【Shimakura Y, Yamazaki Y.: Journal of Craniofacial Surgery 14(1):108-116, 2003】と、その長期に凍結保存された骨由来間葉系細胞(MSCs)による再生医工学を用いたハイブリッド型人工骨の開発【Matsuo A, Yamazaki Y, ら J Craniofac Surg.19(3):693-700,2008.など】を行ってきた。その結果、唇顎裂や唇顎口蓋裂患者各自の骨由来間葉系幹細胞を長期に凍結保存させ、各患者の必要な時期に必要な量をdonor siteに侵襲を加えることなく骨由来間葉系細胞(MSCs)のよるハイブリッド型人工骨を準備し臨床に供することが可能な段階となるに至り、凍結保存骨由来間葉系細胞の細胞遺伝学的性状の安全確認として染色体数分析と染色体染色による核板バンドパターン変化を行い、特に異常を認めない結果を得ている。

【平成14-15年度】ヒト骨髄間葉系細胞からの骨芽細胞の分離・保存・増殖法の確立と臨床展開の可能性 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費助成金、基盤研究 C。

【平成16-17年度】凍結保存自己幹細胞(骨髄由来間葉系幹細胞)を用いたハイブリッド型人工骨の開発 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費助成金、基盤研究C。

【平成18-19年度】凍結保存幹細胞(骨髄由来間葉系幹細胞)の継代培養時の変化とその安全性 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費助成金、基盤研究C。

臍帯血からの自己血清, scaffold(フィブリンネット: PPP), 成長因子(PRP)を用いて、顎裂部骨移植年齢時に再構成骨組織を代替骨としての臨床展開可能性を検討した。医療技術の進歩に伴い、妊婦の胎児エコー検査により出生前に胎児の口唇裂・口蓋裂診断が可能となっている現在、本学でも術前診断に基づき紹介があり、年々増加傾向にある。胎児診断のご両親への形成外科的なケアは勿論であるが、出産時の臍帯血由来から自己血清, scaffold(フィブリンネット: PPP), 成長因子(PRP)単離し, 凍結保存後も有用であることを報告した。【Baba K, Yamazaki Y, Ikemoto S, Aoyagi K, Takeda A, Uchinuma E: Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 40: 768-772, 2012. Baba K, Yamazaki Y, Takeda A, Uchinuma E: Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 41: 775-782, 2013】

【平成20-22年度】臍帯血由来間葉系幹細胞の凍結保存と唇顎口蓋裂患者への臨床応用の可能性。文部科学省科学研究費助成金, 基盤研究C

また腸骨海綿骨に依存しない学童期での顎裂部骨移植が可能と考え口蓋骨・上顎骨に着眼した。口蓋骨・上顎骨は口唇裂・口蓋裂治療で行われる従来の手術時に過剰な侵襲を患者に与えることなく採取でき、骨形成を得たい顎裂部と解剖学的に隣接している部位である。そこで口蓋骨・上顎骨が MSCS 供給源として可能か否か、また自己血清の代替として無血清培地が適切か否か等を検討した。その結果、上顎骨由来の hMSCS は有用でありまた無血清培地も臨床展開可能と判断した。【Ishiguro M, Yamazaki Y, Baba K, Kumazawa K, Sugimoto T, Takeda A, Uchinuma E: The Kitasato Medical Journal The

Kitasato Medical Journal 2013.】

【平成23-25 年度】再生医工学を用いた腸骨海綿骨非依存型顎裂部骨移植の臨床展開の可能性について. 文部科学省科学研究費助成金 基盤研究C

さらに、顎顔面骨欠損(顎裂部骨欠損を含む)に対して適材適所な代替骨の選択基準を検討した. その結果骨形成能の高い組合せの順として、骨組織由来間葉系細胞

(hMSCS) の培養上清 + hMSCS + scaffold > hMSCS + scaffold > hMSCS の培養上清 + scaffold > Scaffold(hydroxyapatite etc)という組み合わせが考えられる. したがってRecipient 側の条件、すなわち欠損の大きさ、周辺組織のviability, 宿主の健康状態等により移植方法を考慮すべきであることが判った. 【Yamazaki Y, Sugimoto T, Sone Y, Takeda A, : P.2633 World Biomaterials Congress 2016】

【平成26-28 年度】臨床に向けて顎骨欠損への適切な再生代替骨の選択. 文部科学省科学研究費助成金 基盤研究C

しかし前回の研究においてhMSCS は発生母地(体幹骨由来か顎顔面骨由来か)によって間葉系細胞の分化能に誘導抑制が存在することが示唆された. そこで今回、細胞を制御している遺伝子発現メカニズムを明らかにすることとともに、顎顔面骨欠損に対してより有用なhMSCS の確認とより有用なそのhMSCS 培養上清を検討する.

2. 研究の目的

唇顎裂や唇顎口蓋裂児の顎裂部骨移植に対しそのDonor としては自家腸骨海綿骨が一般的である. そこで我々はその腸骨負担を回避や軽減する目的で数年来、ヒト骨組織由来間葉系細胞(以下, hMSCS とす)による代替骨開発のための基礎研究を行って来ている. その結果、すべての顎顔面骨欠損に対してhMSCS が必要ではなく、骨欠損部位の環境によってはhMSCS の培養上清でも骨欠損修復が十分に可能であり、その培養上清の有用性として各種成長因子の他にエクソソーム(miRNA)の存在が明らかとなった. またその一方、hMSCS は発生母地(体幹骨由来か顎顔面骨由来か)によって間葉系細胞の分化能に誘導抑制が存在することが示唆された. そこで、今回網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)を行い、それぞれの細胞を制御している遺伝子発現メカニズムを明らかにすることとともに、顎顔面骨欠損に対してより有用なhMSCS の確認とより有用なそのhMSCS 培養上清を検討する.

発生母地の異なる骨組織のhMSCS を用いて骨組織由来間葉系細胞の骨細胞分化、脂肪細胞分化、軟骨細胞分化等の多分化能をin vitro で定性、定量、RNA の発現量を検索する.

発生母地の異なる骨組織のhMSCS を用いて網羅的遺伝子発現解析により骨組織由来間葉系細胞の制御遺伝子メカニズムの探索

凍結保存hMSCS を骨分化誘導しその培養上清より経時的に免疫補足法でエクソソームを抽出し. その骨分化誘導の各時期に抽出されるエクソソームの生物科学的活性と骨形成能とを in vitro, in vivoで検討する.

骨組織由来間葉系細胞の分化能・増殖能・老化現象の確認

—20年・15年・10年・5年・1年の凍結保存検体を用いて—

3. 研究の方法

発生母地の異なる骨組織の hMSCS を用いて骨組織由来間葉系細胞の in vitro での分化能解析:

年齢 5~26 歳、腸骨 3 例、上顎骨 3 例、下顎骨 3 例、歯槽骨 3 例の計 12 検体を用いた.

初代培養後第2継代後に、骨誘導培地・脂肪誘導培地・軟骨誘導培地を用いて細胞分化能の差異を検討し、その定性・定量測定を行った。

発生母地の異なる骨組織由来間葉系細胞の網羅的遺伝子発現解析：

腸骨、上顎骨、下顎骨の骨片検体(各 n=3)から MSCs を単離し、RNA を抽出した後、ion Proton により RNA-seq を施行した。Tophat2-Cufflinks パイプラインを用いて定量化、発現変動解析を行った後、Differentially expressed genes (DEGs) について詳細な調査をした。

骨分化誘導の各時期に抽出されるエクソソームの生物科学的活性と骨形成能とを in vitro, in vivo で検討：

[エクソソーム精製]エクソソームは免疫学的捕獲法 (Miltenyi Biotec Exosome Isolation KitPan®ヒト) を使用して hMSCs から骨分化を誘導することにより精製。

In vitro 実験 - 骨分化誘導7日目、10日目、14日目の培養上清中のエクソソーム精製。その各エクソソームを骨由来間葉系細胞の培養上清中に2回/週で添加し4週間培養し培養上清中のCa定量を行った。コントロールは骨由来間葉系細胞を通常の4週間骨分化誘導し培養上清中のCa定量を行った。

In vivo 実験 - (1)3日間培養の上清からの7.5倍のエクソソーム群(2)7日目の上清からの7.5倍のエクソソーム群(3)非骨誘導培地からのエクソソーム群(4)エクソソームを含まない群の4群を作成。各群のエクソソームによる骨由来間葉系細胞の分化誘導の1週間後、ヒドロキシアパタイト(HA)ディスクに播種後、ヌードマウスの背中に4週間皮下移植し組織学的に検討した。

骨組織由来間葉系細胞の分化能・増殖能・老化現象の確認：

ヒト骨組織由来間葉系細胞を凍結保存した検体15例(男性7例、女性8例)で、20年目から1年目までの年代各3検体ずつとした。生死判定としてCalcein/EthD染色後、共焦点顕微鏡で観察を行い、WST-8による細胞増殖試験を1週間行った。老化増殖因子であるSA-galの過剰蓄積の有無を共焦点顕微鏡で観察した。分化能は脂肪・骨分化、非分化誘導群の3群で培養を行った。脂肪、骨形成能として4週間培養継続した細胞に対して、脂肪染色、Ca染色、Ca定量を行い検討した。

4. 研究成果

発生母地の異なる骨組織のhMSCsを用いて骨組織由来間葉系細胞のin vitroでの分化能解析：

骨誘導能については、Ca濃度は分化誘導を行なった群で誘導2~3週目より増加するとともにアリザリンS染色に染色された。石灰化の強さはNon-repeated measure ANOVA+Kruskal Wallis H-testでは有意差が認められなかった。脂肪誘導能については、分化誘導を行なった群はオイルレッドO染色に染色された。染色による脂肪滴形成能の強さは3群に分かれ、腸骨由来>下顎骨由来>上顎骨由来の順であり、歯槽骨由来は脂肪への分化誘導を認めなかった。軟骨形成能については、RT-PCRによる軟骨形成能の強さは3群に分かれ、強さの順に腸骨由来>歯槽骨由来>上顎骨由来=下顎骨由来であったが、歯槽骨由来は軟骨誘導を認める群と認めない群の2群に分かれた。以上の結果より腸骨・顎骨の採取部位によるMCsの分化誘導の差を認めた。【Kazuno Moriyama, Yasuharu Yamazaki, et al.: Difference in pluripotency of jaw and iliac bone-derived mesenchymal cells. The Kitasato Medical Journal 50:18-26, 2020】

発生母地の異なる骨組織由来間葉系細胞の網羅的遺伝子発現解析：

腸骨由来 MSCs (I-MSCs)と上顎骨由来 MSCs (Mx-MSCs)・下顎骨由来 MSCs (Md-MSCs)との発現変動解析を行ったところ、I-MSCs vs. Mx-MSCs では 973、I-MSCs vs. Md-MSCs では 365 の DEGs を検知した。また、I-MSCs で著明な発現上昇を認めた DEGs を確認したところ、その多くは HOX 遺伝子であることがわかった。以上の結果より腸骨と顎骨(上顎骨・下顎骨)では骨化過程が異なっており、発生段階における制御遺伝子の違いが、MSCs の持つ特性の違いにつながると考えられた。【Satoru Onizuka, Yasuharu Yamazaki, et al.: RNA-sequencing reveals positional memory of multipotent mesenchymal stromal cells from oral and maxillofacial tissue transcriptomes. BMC Genomics.

(in submission)】

骨誘導の各時期に抽出されるエクソソームの生物科学的活性と骨形成能とを in vitro, in vivo で検討：

各時期のエクソソームを骨由来間葉系細胞の培養上清中に 2 回/週で添加し 4 週間培養し培養上清中の Ca 定量を行ったがいずれのエクソソームも骨由来間葉系細胞の骨分化を示す Ca 濃度の上昇は認めなかった。また動物実験においても各時期エクソソーム分化による骨形成は確認できなかったが、各時期のエクソソーム分化群では旺盛な血球系細胞浸潤を認めた。このことからエクソソームは移植環境と細胞流入に関連する可能性が示唆された。

骨組織由来間葉系細胞の分化能・増殖能・老化現象の確認：

生死判定では凍結年数が長いほど生細胞が減り、老化判定では 5 年以降は同様な陽性反応を示し、年数依存性は認めなかった。細胞増殖試験では凍結年数による統計的優位差は認めなかった。骨分化能及び脂肪分化能はそれぞれ非誘導群に比較し誘導群は統計的優位さをもって生成されているのを確認した。しかし各年代間での誘導群同士の有意差は認めなかった。従って 20 年間凍結保存した検体でも骨分化能及び脂肪分化能を有していることが分かった。しかしその分化能は骨分化あるいは脂肪分化のどちらかに傾く傾向があることが推定された。凍結による老化は進んでいない可能性が示唆され、長期凍結保存された検体に関して基礎研究に有益と考えられた。【Yoshika Sugimoto, Yasuharu Yamazaki, et al. : Differentiation and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation-Comparison among cells stored for 1, 5, 10, 15, and 20 years. Regenerative Therapy (in press)】

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kazuno Moriyama, Yasuharu Yamazaki, Yoshika Sugimoto, Takayuki Sugimoto, Kenichi Kumazawa, Kyoko Baba, Yumiko Sone, Akira Takeda	4. 巻 50
2. 論文標題 Difference in pluripotency of jaw and iliac bone-derived mesenchymal cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Kitasato Medical Journal	6. 最初と最後の頁 18-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yoshika Sugimoto, Yasuharu Yamazaki, Kazuno Moriyama, Takayuki Sugimoto, Kenichi Kumazawa, Kyoko Baba, Yumiko Sone, Akira Takeda	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Differentiation and proliferation potencies of human bone tissue-derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation-Comparison among cells stored for 1, 5, 10, 15, and 20 years	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Yumiko Sone, Yoshika Sugimoto, Kazuno Moriyama, Takayuki Sugimoto, Kennichi Kumazawa, Yasuhito Shimakura, Akira Takeda	4. 巻 47
2. 論文標題 An in vitro long-term study of cryopreserved umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma containing growth factors PDGF-BB, TGF- β , and VEGF	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery	6. 最初と最後の頁 668-675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcms.2019.01.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Keiichi Park, Hideki Amano, Yoshiya Ito, Yoshio Mastui, Mariko Kamata, Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Masabumi Shibuya, Masataka Majima	4. 巻 93
2. 論文標題 Vascular endothelial growth factor receptor 1 (VEGFR1) tyrosine kinase signaling facilitates granulation tissue formation with recruitment of VEGFR1+ cells from bone marrow	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Association of Anatomists 2017	6. 最初と最後の頁 372-383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12565-017-0424-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉本佳香、山崎安晴、森山和の、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田啓
2. 発表標題 20年長期凍結保存した骨由来間葉系細胞の分化能・増殖能及び長期継代を繰り返した細胞との老化染色の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場 香子、山崎 安晴、曾根 由美子、杉本 佳香、森山 和の、杉本 孝之、熊澤 憲一、武田 啓
2. 発表標題 シュワン細胞との共培養によるヒト臍帯由来間葉系細胞の分化能の検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉本佳香、山崎安晴、森山和の、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田啓
2. 発表標題 長期凍結保存した骨由来間葉系細胞の分化能・増殖能の検討ー20年、15年、10年、5年、1年の保存検体を比較してー
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場香子、山崎安晴、杉本佳香、森山和の、杉本孝之、熊澤憲一、武田 啓
2. 発表標題 共培養で得られた臍帯間葉系細胞由来再生軟骨の組織学的評価
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本佳香、山崎安晴、森山和の、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田 啓
2. 発表標題 骨組織由来間葉系細胞の分化能・増殖能・老化現象の確認 ~ 20 年・15 年・10 年・5 年・1 年の保存検体を用いて~
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山和の、山崎安晴、杉本佳香、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田 啓
2. 発表標題 顎骨由来および腸骨由来間葉系細胞の多分化能の差異について
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuharu Yamazaki, Yoshika Sugimoto, Kazuno Moriyama, Kyoko Baba, Yumiko Sone, Takayuki Sugimoto, Takanori Iwata, Satoru Onizuka, and Akira Takeda
2. 発表標題 Biological differences of human mesenchymal cells derived from different bone tissues and comprehensive gene expression analysis.
3. 学会等名 Society For Biomaterials,2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshika Sugimoto, Yasuharu Yamazaki, Kazuno Moriyama, Kyoko Baba, Yumiko Sone, Takayuki Sugimoto, Kenichi Kumazawa, and Akira Takeda
2. 発表標題 Examination of Exosome purification method derived from culture supernatant of the mesenchymal cells from human ilium bone(hBMCs) which we chose, and its bone differentiation inducibility.
3. 学会等名 Society For Biomaterials,2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎安晴、杉本佳香、森山和の、曾根由美子、馬場香子、杉本孝之、鬼塚 理、岩田隆紀、武田 啓
2. 発表標題 顎骨vs腸骨由来間葉系細胞の生物学的差異と網羅的遺伝子発現解析
3. 学会等名 第26回日本形成 外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉本 孝之 (Sugimoto Takayuki) (20365133)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究分担者	馬場 香子 (Baba Kyoto) (90327411)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究分担者	杉本 佳香 (Sugimoto Yoshika) (90775941)	北里大学・医学部・助教 (32607)	
研究分担者	森山 和の (Moriyama Kazuno) (40803515)	北里大学・医学部・助教 (32607)	